

[Back to list](#)1-1/1 [Next page](#) From 1 - 1 CountDisplay format ----- Select the Type of Output -----[Display checked documents](#)[Check All](#) [Uncheck All](#)

\*\* Result [P] \*\* Format(P801) 2006.05.19

1/ 1

[C](#)

Application No./Date: 1983-165066[1983/ 9/ 9]  
 Public Disclosure No./Date: 1985- 58074 **Translate** [1985/ 4/ 4]  
 Registration No./Date: 1575625[1990/ 8/24]  
 Examined Publication Date (present law): [ ]  
 Examined Publication No./Date (old law): 1989- 56756 **Translate** [1989/12/ 1]  
 PCT Application No.: [ ]  
 PCT Publication No./Date: [ ]  
 Preliminary Examination: ( )  
 Priority Country/Date/No.: ( ) [ ] ( )  
 Domestic Priority: [ ] ( )  
 Date of Request for Examination: [1988/ 7/12]  
 Accelerated Examination: ( )  
 Kind of Application: (0000)  
 Critical Date of Publication: [1983/ 9/ 9] ( )  
 No. of Claims: ( 1)  
 Applicant: UDAKA JUZO  
 Inventor: UDAKA JUZO, TSUKAGOSHI NORIHIRO, YAMAGATA HIDEO  
 IPC: C12N 15/00 C12N 1/20 (C12N 15/00  
 C12R 1:08 ) (C12N 1/20 C12R 1:08 )  
 FI: C12N 15/00 A C12R 1:08 C12N 1/20 G  
 C12N 15/00 C12N 15/00 C12N 1/20 C12N 1/20  
 F-Term: 4B024KA20, KD06, KD07, KE04, KF12, 4B065AA15X, AA18Y, AB01, AC10, AC14, AC15, BA0  
 2, BD32, CA32, 4B024AA20, BA13, CA01, DA07, EA04, FA13, GA11  
 Expanded Classification: 145, 141  
 Fixed Keyword:  
 Citation:  
 [19,1989. 1.31,04 ] (04,JP,Unexamined Patent Publication,1981015300)  
 [19,1989. 1.31,04 ] (04,JP,Unexamined Patent Publication,1982132895)  
 Title of Invention: PLASMID AND TRANSFORMATION OF BACILLUS BREVIS USING IT

Abstract: NEW MATERIAL:A plasmid having at least a drive unit range of plasmid pUB 110, and contained in the cell of Bacillus brevis. USE: A transforming agent for Bacillus brevis. Since Bacillus brevis has low protease activity, formed protein is not decomposed. PREPARATION: For example, plasmid PHC79 and plasmid pUB110 are linked at EcoR I site, a gene having erythromycin resistance derived from plasmid pHW1 obtained by scissoring at Hind III and Cla I is inserted into it, to give shuttle vector pEB3. BamH I fragment of 0.9kb is removed from this plasmid pEB3, to give plasmid pHT-1. COPYRIGHT: (C)1985, JPO&Japio

[Check All](#) [Uncheck All](#)[Display checked documents](#)Display format ----- Select the Type of Output -----1-1/1 [Next page](#) From 1 - 1 Count[Back to list](#)

BEST AVAILABLE COPY

2006/05/19

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60-58074

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)4月4日

C 12 N 15/00  
C 07 H 21/04  
// (C 12 N 15/00  
C 12 R 1:08)

7115-4B  
7252-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 プラスミドおよびそれを用いてバチルス・プレビスを形質転換する方法

⑯ 特 願 昭58-165066

⑰ 出 願 昭58(1983)9月9日

特許法第30条第1項適用 昭和58年3月10日 社団法人日本農芸化学会発行の日本農芸化学会昭和58年度大会講演要旨集において発表

⑱ 発 明 者	鶴 高	重 三	名古屋市名東区植園町1-24-3
⑱ 発 明 者	塚 越	規 弘	名古屋市名東区猪高町大字猪子占字社口9-391
⑱ 発 明 者	山 形	秀 夫	名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-256
⑲ 出 願 人	鶴 高	重 三	名古屋市名東区植園町1-24-3
⑳ 代 理 人	弁理士	久保田 藤郎	

明 細 書

1. 発明の名称

プラスミドおよびそれを用いてバチルス・プレビスを形質転換する方法

2. 特許請求の範囲

1. プラスミド pUB110 のドライブユニット領域を少なくとも有し、バチルス・プレビスの細胞内に含まれているプラスミド。

2. バチルス・プレビスの細胞内にプラスミド pUB110 のドライブユニット領域を少なくとも有するプラスミドを導入することを特徴とするバチルス・プレビスの形質転換方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はプラスミドおよびそれを用いてバチルス・プレビスを形質転換する方法に関する。

バチルス・プレビス (*Bacillus brevis*) は衣層蛋白質を細胞外に多量に分泌し、またプロテアーゼ活性が少ない。

本発明者らは、バチルス・プレビスのこのよう

な性質に着目し、本菌は組換え DNA の受容菌として好適なものであると考えた。

しかるに、これまでにバチルス・プレビスにおいてはコピー数の多いプラスミドは見出されていない。このような事情のため、バチルス・プレビスの DNA 受容菌としてすぐれた性質は利用されていなかった。

そこで、バチルス・プレビス細胞内でよく増殖できるプラスミドベクターの開発が強く要望されている。

本発明者らは、スタフィロコッカス・アウレウス由来のプラスミドであつてバチルス・ズブチリスを宿主とするベクターとして広く使用されている pUB110 (Oryozan, T. J., S. Contento and D. Dubnan (1978) J. Bacteriol. 134, 318-329) に注目し、このプラスミドベクター pUB110 を用いてバチルス・プレビスを形質転換したところ、pUB110 はバチルス・プレビス細胞内で極めてよく増殖することならびに該プラスミド pUB110 に外来遺伝子を挿入し、このプラスミドを用いて

バチルス・プレビスを形質転換せしめたところ、この外来遺伝子の情報を効率よく発現することを見出した。

本発明は第1にプラスミドpUB110のドライブユニット領域を少なくとも有するプラスミドであつてバチルス・プレビスの細胞内に含まれているプラスミドを提供するものであり、第2にバチルス・プレビスの細胞内にプラスミドpUB110のドライブユニット領域を少なくとも有するプラスミドを導入することを特徴とするバチルス・プレビスの形質転換方法を提供するものである。

ここで、ドライブユニット領域とはori領域と同義であり、宿主細胞内でプラスミドが増殖する機能を司るDNA領域を意味する。本発明のプラスミドpUB110のドライブユニット領域を少なくとも有するプラスミドとしてドライブユニット領域のほかに薬剤耐性などの宿主細胞内に導入されたときに、その宿主を形質転換して当該プラスミドが導入されていない宿主と区別出来るようにするための、いわゆるマーカー遺伝子が含まれ

ているものを用いることが望ましい。さらに、プロモーター配列を入れておくこともでき、そのほか発現させるべき蛋白質をコードする遺伝子、蛋白質を細胞外に分泌せしめるに必要なDNAなどが挿入されていてもよい。すなわち、これらマーカー遺伝子、プロモーター配列、外来遺伝子および/または蛋白質分泌のためのDNAが挿入されているプラスミドのいずれも本発明におけるプラスミドに含まれるものである。

本発明のpUB110由来の新しいプラスミドは具体的には次のようなものがある。すなわち、第1図に制限酵素切断地図を示したプラスミドpEB-2はpUB110とpBR322を結合したものであり、大腸菌(*E. coli*)とバチルス・プレビス(*Bacillus brevis*)におけるシヤトルベクターであり、いずれの細菌においてもコピー数が多いという特色がある。図中、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性、Tet<sup>r</sup>はテトラサイクリン耐性、Nm<sup>r</sup>はネオマイシン耐性を示す。第2図に、本発明の新しいプラスミドであるpEB-3およびpHT-1の制限酵

素切断地図およびその造成経過を示す。pHT-1はpUB110と同様にバチルス・プレビスでコピー数の多いプラスミドであり、ネオマイシン耐性遺伝子(Nm<sup>r</sup>)のほかにエリスロマイシン耐性遺伝子(Em<sup>r</sup>)を含んでいる。さらに、pUB110 DNAに存在した制限酵素切断部位以外にHind IIIにより1箇所切断される部位をもっている。また、pUB110とα-アミラアゼを結合させて得たプラスミドpBAM-102の制限酵素切断地図を第3図に示す。

上記各プラスミドを導入した大腸菌およびバチルス・プレビスはいずれも微工研に寄託されており、菌株名と寄託番号は以下の通りである。

<i>Escherichia coli</i>	HB101/pEB-2	FERM P-7227
"	HB101/pEB-3	FERM P-7228
<i>Bacillus brevis</i>	47/pHT-1	FERM P-7226
"	47/pBAM-102	FERM P-7225

本発明において宿主として用いるバチルス・プレビスにはたとえばバチルス・プレビス47のほかにバチルス・プレビス481, 144, 899な

どがある。また、プラスミドベクターの例としては上記した4種類のプラスミドがある。

バチルス・プレビスを形質転換する方法としては以下のような方法がある。

高浸透圧液(高張溶液とも云う。)に浮遊した細胞にリゾチームを作用させて生じたプロトプラスト(細胞壁を失った裸の細胞)にポリエチレングリコールを用いてプラスミドDNAを導入する方法や後述するように、アルカリ性トリス塩酸緩衝液による処理で表層蛋白質を除去した細胞(細胞壁の蛋白質のみを失った細胞)にポリエチレングリコールを用いてプラスミドDNAを導入する方法がある。

本発明のプラスミドを用いることによつてバチルス・プレビスを容易に形質転換することができ、このバチルス・プレビスは蛋白質を宿主外に多量に生産する能力を有しており、しかもプロテアーゼ活性がないので、生成した蛋白質が分解されない。したがつて、動物、植物および微生物由来の遺伝子を組込んだ場合、その遺伝子の有する

遺伝情報は高い効率で発現され、かつ生成した蛋白質は分解されず菌体外に分泌される。なお、本発明のプラスミドを組み込んで形質転換したバチルス・プレビスの培養は通常のバチルス・プレビスの培養と同じ方法で行なえばよい。

次に、本発明を実施例により説明する。

#### 実施例 1

第2図に示したように、プラスミド pH079 (Hohn, B. and Collins, J. (1980) *Gene* 11, 291-298) とプラスミド pUB110 (Grysan, T. J., S. Contente and D. Dubman (1978) *J. Bacteriol.* 154, 318-329) とを *EcoRI* 部位で結合したものを *HindIII*, *GlaI* で切断し、これに *HindIII*, *GlaI* で切断して得たプラスミド pHW1 (Horinouchi, S. and B. Weisblum (1982) *J. Bacteriol.* 150, 804-814) 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入することによつてシャトルベクター pEB3を得た。

次いで、このプラスミド pEB3 から 0.9 Kb の *BamHI* 断片を除去することによりプラスミド pHT

-1を得た。

#### 実施例 2

プラスミド pBR322 とプラスミド pUB110 を用い、実施例1と同様にしてこれらを *EcoRI* 部位で結合することにより、第1図に示したプラスミド pEB2を得た。

#### 実施例 3

##### (1) 好熱性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の分離

バチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearothermophilus*) DY-5 の好熱性  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を含むプラスミド pHI301 より  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を以下のようにして調製した。

プラスミド pHI301 (特願昭58-50148号明細書参照) を制限酵素 *EcoRI* で部分的に加水分解後、再び *BamHI* で部分的に加水分解し、種々の長さの DNA を調製し、これを  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子として用いた。

##### (2) バチルス・ズブチリスとバチルス・プレビス 47 への好熱性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のクローニング

図である。

上記  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の入ったプラスミドを有する枯草菌よりプラスミドを Birnboim, H. O. and Doly, J. の方法 (*Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523 (1979)) により抽出し、セシウムクロライド-エチジウムブロマイド超遠心分離法でさらにプラスミド DNA を精製したのちバチルス・プレビス 47 菌の形質転換に使用した。

まずはじめにアルカリ性トリス塩酸緩衝液による処理によつてバチルス・プレビスの表面蛋白質を除去し、残されたペプチドグリカン層と細胞質膜によつてのみ囲まれた細胞にポリエチレングリコールを用いてプラスミド DNA を導入した。すなわち、 $T_2$  培地に前培養したバチルス・プレビスの菌液を新しい  $T_2$  培地 5 ml に 100 分の 1 希釈し、37℃で振とう培養を行ない、対数増殖後期 (O.D. 660 nm = 1.9) に達したとき、菌体を遠心 (5000 g, 5 分, 室温) によつて集め、50 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 5 ml により洗浄した後、50 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)

ベクター・プラスミドとして pUB110 を用いた。まず、プラスミド pUB100 を制限酵素 *EcoRI* および *BamHI* で切断し、5' 末端のリン酸基をバクテリアル・アルカリ・ホスファターゼ処理により除去し、線状プラスミド pUB110 を調製した。

前記好熱性  $\alpha$ -アミラーゼ DNA と線状プラスミド pUB110 を混合し、 $T_4$  DNA リガーゼで両 DNA を連結した。

連結した DNA を枯草菌 (*B. subtilis*) 1A289 ( $\alpha$ -アミラーゼ陰性株) に Chang, S. and Cohen, S. H. のプロトプラスト法 (*Molec. Gen. Genet.* 168, 111-115 (1979)) で形質転換し、カナマイシン耐性により多数の形質転換株を得た。これらの形質転換株を 1% 可溶性デンプンと 10  $\mu$ g/ml カナマイシンを含む Difco Antibiotic medium 3 プレート上にレプリカし、1夜培養後、ヨードデンプン反応によりコロニーの周辺が無色になっているものを検索することによつて  $\alpha$ -アミラーゼ生産株を選別した。第3図は  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子が入ったプラスミド pBAM-102 の制限酵素切断地

に懸濁し、37℃で振とうした。60分後、菌体を遠心(3000g, 5分, 室温)によつて集め、0.5mlのTP増地(0.953%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.426%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5% 肉エキス, 1% ポリペプトン, 0.2% 酵母エキス, 1% グルコース)に懸濁した。これにプラスミドDMA溶液(10mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.5, 1mM EDTA)とTP増地の1:1混合液100 $\mu\text{L}$ を加えて混合した。次いで、直ちに40%ポリエチレングリコール溶液(0.953%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.426%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40% (w/v) ポリエチレングリコールPEG6000)1.5mlを加えて攪拌し、37℃で10分間振とうした。しかる後、遠心(3000g, 5分, 室温)により菌体を集め、20mM  $\text{MgCl}_2$ を添加した $T_2$ 増地に懸濁した。37℃で150分間振とうした後、形質転換体選択用の寒天増地(60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のネオマイシンを含む $T_2$ 増地プレート(ポリペプトン1%, 肉エキス0.5%, ~~酵母エキス0.5%~~, 酵母エキス0.2%, グルコース1%, ウラシル0.01%, pH 7))に0.1mlずつ散布した。37℃で50時間培養し

てネオマイシン耐性株を得た。これらの形質転換株を1%可溶性デンプンと60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ネオマイシンを含む $T_2$ 増地プレート上にレプリカし、1夜培養後、ロードデンプン反応によりコロニー周辺が無色になつたものを検索することによつて $\alpha$ -アミラーゼ生産株(バチルス・プレビス47/pBAM-102 (FERM P-7225))を選択した。

### (3) $\alpha$ -アミラーゼの生産性

第5図に示すプラスミドを有する枯草菌ならびにバチルス・プレビス47菌を60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ネオマイシンまたは10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含む $T_2$ 液体増地に接種し、37℃で22時間培養し、遠心分離により培養液を調製して培養液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を不破の方法(J. Biochem. 41, 585-605 (1954))により40℃で測定した。結果を第1表に示す。

第1表

 $\alpha$ -アミラーゼ活性(単位/ml)

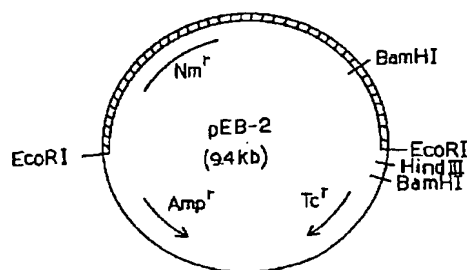
宿 主	$T_2$ 増地+ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン	$T_2$ 増地+ 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ネオマイシン
枯草菌IA289	76	575
バチルス・プレビス47菌	530	3600

枯草菌およびバチルス・プレビス47菌で作られる $\alpha$ -アミラーゼはすべて菌体外に分泌され、耐熱性を示した。第1表に示したように、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を含む同じプラスミドの存在によつてバチルス・プレビス47菌を宿主とした場合には、枯草菌におけるよりも約10倍に及ぶ多数の $\alpha$ -アミラーゼが生産された。

### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明のプラスミドpEB-2の制限酵素切断地図、第2図は本発明のプラスミドpEB-3およびpHT-1の制限酵素切断地図およびこれらプラスミドの造成経過を示すものである。第3図は本発明のプラスミドpBAM-102の制限酵素切断地図である。

第1図

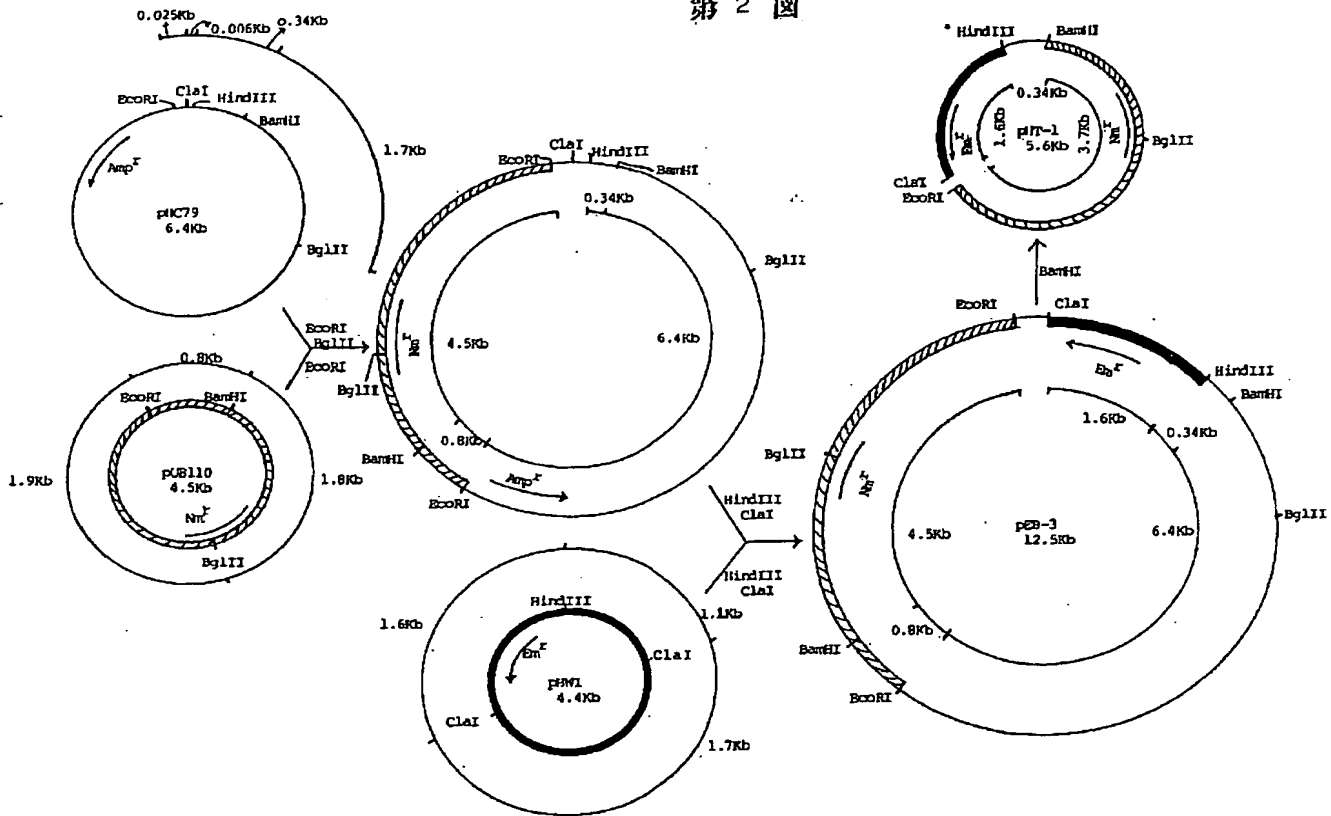


特許出願人 鶴 高 重 三

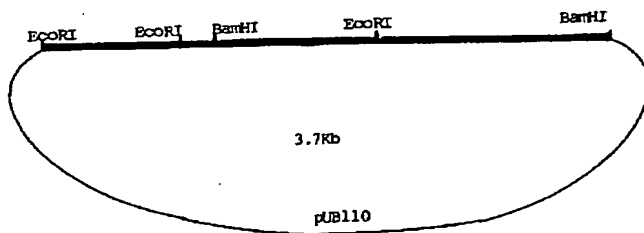
代 理 人 弁 理 士 久 保 田 藤 郎



第2図



第3図



手続補正書(自発)

昭和58年10月6日

特許庁長官 若杉和夫 殿

1. 事件の表示

特願昭58-165066

2. 発明の名称

プラスミドおよびそれを用いてバチルス・  
プレビスを形質転換する方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

嶋高重三

4. 代理人

〒104

東京都中央区京橋1丁目1番10号

西筋ビル5階

(7407) 弁理士 久保田 藤郎

電話(275)0721番



5. 補正の対象

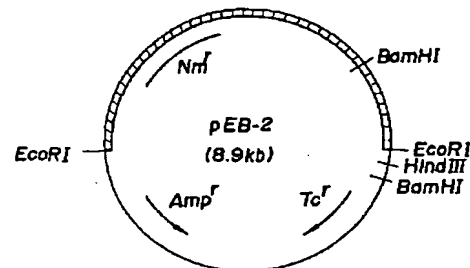
明細書の発明の詳細な説明の欄および図面

6 補正の内容

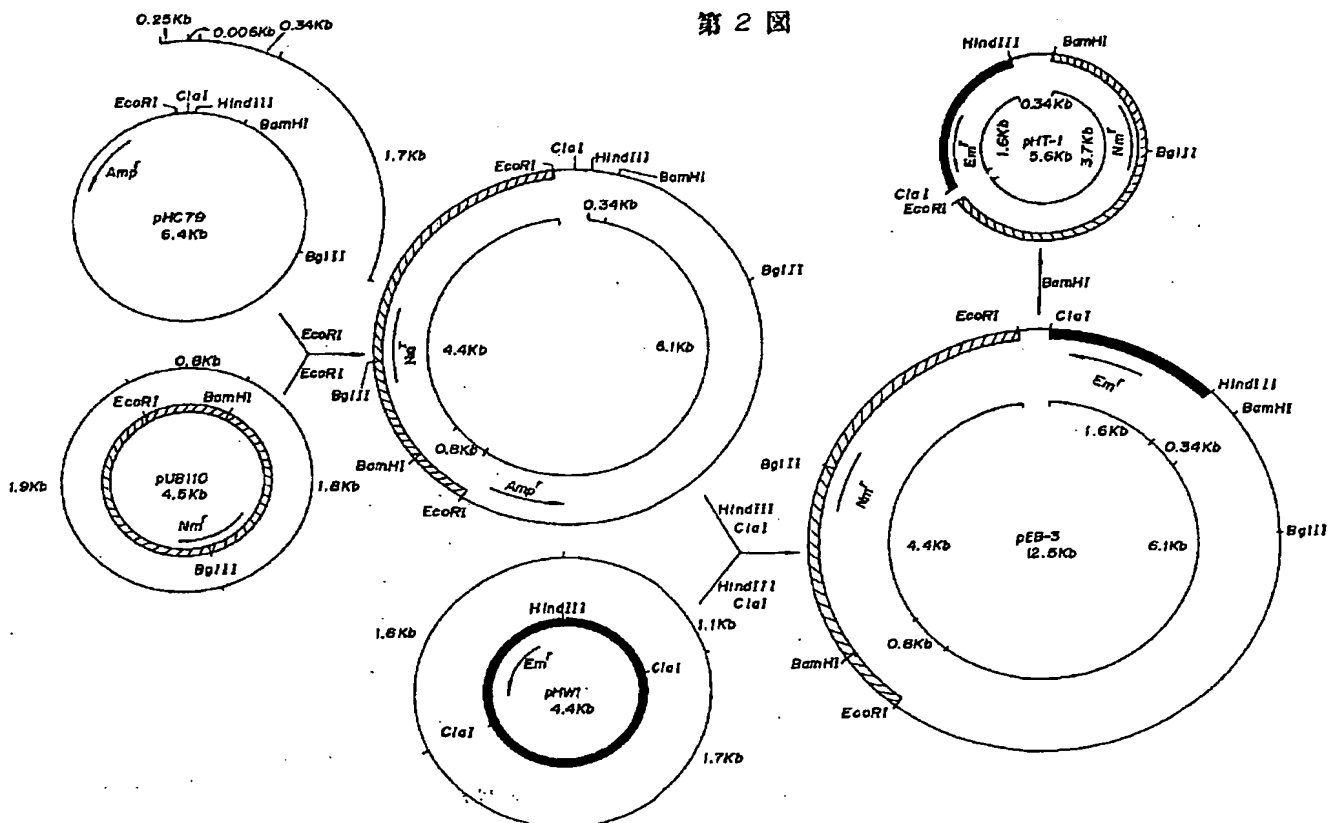
- (1) 明細書第2頁下から6行目の「Dubnan」を「Dubnau」に訂正する。
- (2) 同第7頁11行目の「D. Dubnan」を「D. Dubnau」に訂正する。
- (3) 同第7頁下から2行目の「0.9 Kb」を「6.9 Kb」に訂正する。
- (4) 第1図～第3図を別紙の通りに訂正する。

(以上)

第1図



第2図



第 3 図

